



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1516-8840

Dezembro 2002

## **Documentos 106**

### **Métodos de Fracionamento e Caracterização da Matéria Orgânica do Solo**

Clenio Nailto Pillon  
João Mielniczuk  
Ladislau Martin Neto

Pelotas, RS  
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Clima Temperado**

Endereço: BR 392 Km 78  
Caixa Postal 403 - Pelotas, RS  
Fone: (53) 275 8199  
Fax: (53) 275 8219 - 275 8221  
Home page: [www.cpact.embrapa.br](http://www.cpact.embrapa.br)  
E-mail: [sac@cpact.embrapa.br](mailto:sac@cpact.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Mário Franklin da Cunha Gastal  
Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia  
**Membros:** Ariano Martins Magalhães Junior, Flávio Luiz Carpena Carvalho,  
Darcy Bitencourt, Cláudio José da Silva Freire, Vera Allgayer Osório  
**Suplentes:** Carlos Alberto Barbosa Medeiros e Eva Choer

Supervisor editorial: Maria Devanir Freitas Rodrigues  
Revisoras de texto: Maria Devanir Freitas Rodrigues/Ana Luiza Barragana Viegas  
Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos  
Editoração eletrônica: Oscar Castro

1ª edição  
1ª impressão (2002): 50 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

Pillon, Clenio Nailto.

Métodos de fracionamento e caracterização da matéria orgânica do solo / Clenio Nailto Pillon, João Mielniczuk, Ladislau Martin Neto. - Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002.

50p - (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 106).

ISSN 1516-8840

1. Matéria orgânica 2. Fertilidade do solo  
I. Mielniczuk, João II. Martin Neto, Ladislau. III. Título. IV. Série.

CDD 631.86

---

## **Autores**

### **Clenio Nailto Pillon**

Dr., pesquisador Embrapa Clima Temperado, Br 392, km 78, Caixa Postal 403, 96001-970, Pelotas, RS, fone (53) 275 8222, e-mail: pillon@cpact.embrapa.br

### **João Mielniczuk**

PhD, professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Av. Bento Gonçalves, 7712, Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, RS, fone (51) 3316 6852, e-mail: mieln@vortex.ufrgs.br

### **Ladislau Martin Neto**

Dr., pesquisador Embrapa Instrumentação Agropecuária, XV de novembro, 1452, Caixa Postal 741, 13560-970, São Carlos, SP, fone (16) 224 2477, E-mail: martin@cnpdia.embrapa.br



# **Apresentação**

Xxxxxxxxxx

*Arione da Silva Pereira*  
Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento



## Sumário

<b>Métodos de Fracionamento e Caracterização da Matéria do Solo .....</b>	<b>9</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>9</b>
<b>Fracionamento químico da matéria orgânica do solo ....</b>	<b>10</b>
<b>Fracionamento físico da matéria orgânica do solo .....</b>	<b>10</b>
Efeito do manejo sobre as frações organo-minerais do solo .....	15
<b>Caracterização qualitativa da matéria orgânica do solo .</b>	<b>19</b>
Ressonância Paramagnética Eletrônica - EPR .....	19
Ressonância Magnética Nuclear do <sup>13</sup> C (RMN <sup>13</sup> C CP/MAS) .....	19
Princípios da técnica de RMN <sup>13</sup> C CP/MAS .....	25
Limitações da RMN <sup>13</sup> C CP/MAS para estudos da matéria orgânica do solo .....	26
Aplicações da RMN <sup>13</sup> C CP/MAS no estudo da matéria orgânica do solo .....	31

Estudo de decomposição de resíduos usando RMN <sup>13</sup> C .....	32
Aplicações da RMN <sup>13</sup> C CP/MAS em estudo de revolvimento do solo e decomposição da matéria orgânica .....	33
Aplicação da RMN <sup>13</sup> C CP/MAS em frações físicas de tamanho de partícula e densidade .....	33
Aplicação da RMN <sup>13</sup> C CP/MAS no estudo de substâncias húmicas .....	34
Aplicação da RMN <sup>13</sup> C CP/MAS em conjunto com outras espectroscopias .....	35
Avaliação da dinâmica da matéria orgânica do solo pela abundância natural do <sup>13</sup> C ( <sup>13</sup> C) .....	35
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>42</b>



# Métodos de Fracionamento e Caracterização da Matéria Orgânica do Solo

---

*Clenio Nailto Pillon*  
*João Mielniczuk*  
*Ladislau Martin Neto*

## Introdução

As alterações no conteúdo e na qualidade da matéria orgânica do solo (MO) têm sido consideradas importantes indicadores de qualidade do solo. Estudos que utilizam métodos e técnicas para isolar e caracterizar os compartimentos da MO do solo podem facilitar o entendimento da dinâmica da MO no ambiente. A MO pode estar presente no solo como partículas orgânicas livres ou ligadas às superfícies dos agregados ou como substâncias húmicas (SHs) ou não húmicas, associadas à fração mineral de diferentes tamanhos de partícula. Os diversos métodos de fracionamento da matéria orgânica do solo (MO) são baseados principalmente na sua localização na matriz mineral (fracionamento físico por tamanho de partícula), no seu grau de associação com a fração mineral (fracionamento físico por densidade) ou em características de solubilidade dos compostos orgânicos (fracionamento químico). O método mais simples de caracterização da MO do solo consiste na determinação de carbono orgânico total (COT) e de nitrogênio total (NT). Caracterizações mais apuradas requerem a combinação de análises químicas e do fracionamento físico. Recentemente, ferramentas espectroscópicas tem proporcionado grandes avanços na determinação da estrutura e funções da MO nos seus diferentes compartimentos.

## Fracionamento químico da matéria orgânica do solo

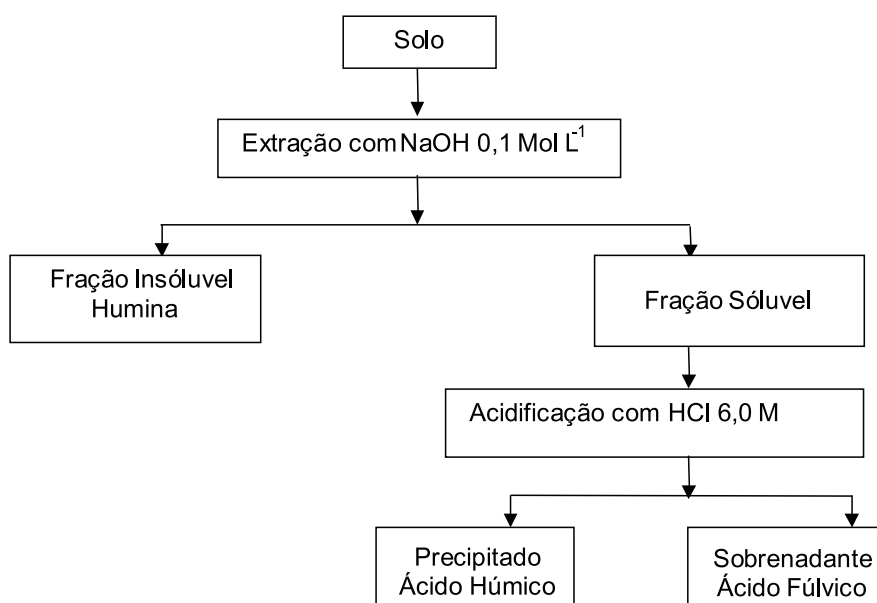
A extração da MO do solo com reagentes químicos permitiu grandes avanços para a definição da composição e arranjo molecular dos principais constituintes da MO do solo, principalmente pela possibilidade da aplicação direta de diferentes espectroscopias sobre o material extraído. Os solos brasileiros geralmente são ricos em metais paramagnéticos, como  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ . Estes metais interferem na aplicação dessas técnicas diretamente sobre o solo inteiro ou sobre suas frações físicas (Stevenson, 1994; Preston, 1996; Bayer et al., 2000). Assim, uma das alternativas de caracterização química da MO tem sido a sua extração e purificação.

As SHs compreendem compostos com alto peso molecular, de coloração amarela a preta, altamente ácidos e formados por reações de síntese secundárias. Segundo Piccolo et al. (1996), em solução, as SHs comportam-se como agregados micelares constituídos por moléculas menores, cuja estabilidade conformacional é determinada predominantemente por ligações hidrofóbicas. Neste modelo, os componentes apolares das SHs são os principais controladores da sua agregação e estabilidade no ambiente. Por outro lado, as substâncias não-húmicas são formadas por moléculas menores, como aminoácidos, carboidratos, lipídios e proteínas (Stevenson, 1994).

Diversos extratores químicos têm sido utilizados para a separação dessas frações da MO. Os mais utilizados compreendem a extração com bases fortes como NaOH 0,1 ou 0,5 M ou sais neutros ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ). Para Stevenson (1994), o método ideal deveria preencher os seguintes requisitos: a) o material extraído não pode ser alterado; b) a extração de SHs é isenta de contaminantes inorgânicos; c) a extração é completa, ou próxima disso e d) o método pode ser aplicável para todos os solos. Entretanto, estas condições são difíceis de serem atendidas. A solubilidade das SHs em meio básico é resultado do rompimento das ligações entre as moléculas orgânicas e argila e cátions polivalentes e da conversão de componentes ácidos em sais solúveis. Os sais de cátions monovalentes (Na e K) são solúveis, mas dos cátions di e trivalentes não. A lixiviação do solo com HCl diluído remove  $\text{Ca}^{2+}$  e outros cátions polivalentes, como  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , aumentando a eficiência da extração. Porém, as SHs fortemente adsorvidas à fração mineral, via coordenação direta ou através de pontes de cátions polivalentes, são seletivamente menos extraídas. Estudos tem indicado que a fração húmica é enriquecida em C de origem alifática, predominantemente de natureza alquílica (Nierop, 1999). Por isso, é importante obter informações de todas as frações da MO obtidas através do fracionamento químico.

Com base na solubilidade dos compostos orgânicos em diferentes pHs, três frações da MO são obtidas pelo fracionamento químico: a fração ácido húmico (AH), solúvel em álcali e insolúvel em ácido; a fração ácido fúlvico (AF), solúvel em meio ácido e básico e a fração humina, insolúvel em qualquer pH, a qual representa a MO associada à fração mineral do solo (Stevenson & Elliott, 1989). Na Figura 1 é apresentado um esquema simplificado do fracionamento químico das Shs.

Em geral, durante o procedimento de extração, uma considerável quantidade de material inorgânico é co-extraída. Procedimentos de purificação utilizando ácidos (HCl e HF) podem ser usados (Skjemstad et al., 1994), mas podem ocorrer perdas seletivas de moléculas orgânicas e alteração de estrutura.



**Figura 1.** Esquema simplificado do fracionamento da matéria orgânica do solo. Adaptado de Stevenson (1994).

A aplicação da Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) e da Ressonância Magnética Nuclear do  $^{13}\text{C}$  com Polarização Cruzada e Ângulo Mágico de Spin (RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS) sobre as frações da MO do solo, obtidas por fracionamento químico e físico, têm possibilitado comparar as informações qualitativas obtidas de frações químicas e de agregados organo-minerais do solo.

Recentemente, Bayer et al. (2000) mostraram que a medida da concentração de radicais livre semiquinona, determinada por EPR, apresentou maior amplitude de variação em agregados organo-minerais do solo sob diferentes sistemas de cultura, do que nas amostras de AH extraídas quimicamente do solo sob os mesmos sistemas. A concentração de radicais livre semiquinona tem sido relacionada ao grau de humificação da MO do solo (Martin-Neto et al., 1998). A menor sensibilidade observada para a fração AH resultou, provavelmente, da exclusão de substâncias com baixo grau de humificação (substâncias não húmicas) durante a preparação e a obtenção desta fração, as quais contribuem pouco para a formação de radicais livre semiquinona, resultando em compostos similares para os diferentes sistemas de cultura. No entanto, os resultados obtidos com agregados organo-minerais e amostras de AH mostraram coerência, confirmando a validade da extração química para estudos qualitativos da MO no solo.

A possibilidade de alteração das moléculas orgânicas e a extração de SH de composição similar, mas de compartimentos distintos da MO do solo, tem levado à utilização, em maior grau, de outras técnicas como o fracionamento físico. A seguir será discutida a separação da MO em frações de tamanho de partícula e densidade.

### **Fracionamento físico da matéria orgânica do solo**

Em oposição ao fracionamento químico da MO do solo, o fracionamento físico permite estudá-la dentro do seu complexo sistema de relações com o ambiente (fração mineral, líquida e biológica), possibilitando relacionar cada compartimento com as suas funções dentro do sistema.

Assumindo que a MO participa da maioria dos processos que ocorrem no solo, a caracterização dos compartimentos da MO e a definição das suas funções no sistema possibilitam melhorar o entendimento da dinâmica de liberação de nutrientes e da formação e estabilidade dos agregados no solo.

Existem três métodos básicos de separação física da MO do solo: peneiramento, sedimentação e densitometria. A separação por peneiramento é usada para partículas com diâmetro  $> 53 \mu\text{m}$ ; a separação por sedimentação é baseada no diâmetro esférico equivalente das partículas (lei de Stokes), que podem variar em tamanho, forma e densidade e é usada para partículas entre  $2\text{-}53 \mu\text{m}$ . Para partículas  $< 2 \mu\text{m}$ , técnicas de centrifugação têm sido utilizadas.

O fracionamento físico por tamanho é baseado na separação de frações da MO que são associadas a constituintes minerais com diferentes tamanhos de partícula. Neste caso, é necessária uma máxima dispersão dos agregados do solo, com mínima alteração da amostra (solubilização ou transferência de MO entre as frações). As frações obtidas representam a MO associada às partículas minerais primárias areia, silte e argila.

A separação da MO leve da amostra, através da flotação em água ou em algum líquido de densidade maior, previamente à dispersão dos agregados, reduz a possibilidade de fragmentação dos resíduos vegetais e incorporação em frações mais finas. Considerando que a MO grosseira representa, em média, 25% da MO total do solo em ambientes tropicais e subtropicais (Shang & Tiessen, 1997; Pillon et al., 1999), a redistribuição de resíduos vegetais pelo ultra-som poderia afetar somente uma pequena fração da MO total do solo.

Quando a dispersão dos agregados é incompleta, uma determinada fração pode ser constituída por partículas primárias de menor tamanho. Por exemplo, a fração silte pode ser formada, em parte, por microagregados oriundos da reunião de partículas de argila fortemente cimentadas, resistentes aos procedimentos de dispersão (Christensen, 1996; Shang & Tiessen, 1998). Em geral, a dispersão do solo tem sido efetuada com ultrassom (Turchenek & Oades, 1979; Catroux & Schnitzer, 1987; Bayer et al., 2000). O princípio do ultrassom consiste no processo de cavitação, que envolve três etapas: nucleação (formação de bolhas), crescimento e implosão. Este processo gera o aquecimento da amostra, podendo afetar a sua composição química e a intensidade da dispersão. Geralmente, cubos de gelo são colocados ao redor do recipiente que contém a amostra para reduzir o aquecimento. Schmidt et al. (1997), usando RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS, monitoraram possíveis alterações na composição química da lignina submetida à dispersão pelo ultra-som. Os resultados não indicaram nenhuma alteração detectável na lignina. O tempo e potência utilizados são importantes, bem como a relação solo:água. Intensa dispersão pode causar esfoliação de partículas minerais, principalmente em minerais tipo 2:1 (Christensen, 1992).

A energia de dispersão ( $E = J \text{ mL}^{-1}$ ) é obtida pela seguinte equação (Schmidt et al. 1997):  $E = (P \times T)/V$ , onde P = potência de saída do ultra-som (W); T é o tempo utilizado na dispersão (s) e V é o volume da suspensão (mL), calculado pela soma do volume de água e o volume ocupado pela massa de solo, utilizando-se para o cálculo uma densidade de partícula de  $2,65 \text{ g cm}^{-3}$ .

Procedimentos alternativos de dispersão têm sido usados, como agitação com bolitas de vidro (Balesdent et al., 1988) e resinas saturadas com sódio (Feller, 1999). O tamanho limite dos complexos organo-minerais primários segue diferentes esquemas de classificação. A fração argila compreende partículas  $< 2 \text{ m}$ , enquanto o silte varia entre  $2\text{-}20 \text{ m}$  e entre  $2\text{-}50 \text{ m}$ . A fração areia varia de  $20\text{-}2000 \text{ m}$  ou  $50\text{-}2000 \text{ m}$  (Christensen, 1992). Os limites de tamanho escolhidos para silte são críticos, especialmente porque uma grande proporção da MO do solo inteiro é associada com esta fração (Bayer, 1996). Intervalos de classes diferentes dificultam a comparação dos resultados.

A separação física por densidade tem sido usada em estudos da MO do solo com duas finalidades principais: separar a fração leve (MO livre) e separar associações organo-minerais no solo (Turchenek & Oades, 1979). A MO leve consiste de resíduos de plantas parcialmente decompostos e seus produtos de decomposição parcial, mas hifas de fungos, esporos e restos animais também podem fazer parte (Spycher et al., 1983; Gregorich & Janzen, 1996).

Líquidos orgânicos foram utilizados por muito tempo no fracionamento por densidade. No entanto, apesar da grande vantagem que oferecem na obtenção de diferentes densidades, seu alto potencial de toxicidade e a contaminação da amostra com C têm motivado o uso de sais inorgânicos, como NaI,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{ZnBr}_2$  e politungstato de sódio.

A MO no solo pode ser encontrada como partículas individuais de plantas parcialmente decompostas e sem associação aos minerais, ou como MO adsorvida sobre os minerais e protegida inter-microagregados ou intra-microagregados (Sollins et al., 1984). Golchin et al. (1994a) separaram duas frações leve da MO do solo, através da flotação em líquido de densidade  $1,6 \text{ g cm}^{-3}$ , antes e após a dispersão dos agregados pelo ultrassom. A MO leve livre representa a MO leve externa aos macroagregados estáveis, como partículas de resíduos vegetais parcialmente decompostos; a MO leve oclusa representa a MO leve protegida no interior dos macro e microagregados. Estas duas frações originam-se de locais diferentes do solo, os quais diferem em acessibilidade aos organismos e, provavelmente, diferem em estabilidade, composição química,

grau de decomposição e função. Os resultados mostraram que as frações leve livre e oclusa podem representar 6,9 a 31,3% e 9,2 a 17,5% do carbono orgânico total (COT), respectivamente. Os dados de RMN <sup>13</sup>C CP/MAS indicaram que a fração leve oclusa apresenta uma menor proporção de C-O-álquil e maior de C-álquil, comparada à MO leve livre, sugerindo um estágio mais avançado de decomposição da MO leve oclusa.

Diversas técnicas e procedimentos têm sido utilizados para separar a MO não associada diretamente à fração mineral, além da fração leve livre. Cambardella & Elliott (1992) dispersaram o solo com hexametáfosfato de sódio e o material orgânico disperso, retido na peneira 53 m, foi chamado de MO particulada. À MO presente na fração areia (53-2000 m), separada por peneiramento, poderia ser atribuído o termo "matéria orgânica grosseira". A composição dessas frações é similar e uma clara distinção funcional entre elas é difícil. Estas frações normalmente encontram-se livres no solo ou depositadas na superfície de agregados, sendo facilmente acessíveis aos microorganismos, apresentam um tempo de permanência curto no solo (< 8 anos) (Gregorich et al., 1995) e a composição é controlada pela constituição química da vegetação local e pelos fatores que afetam a dinâmica de decomposição desses resíduos no solo.

### **Efeito do manejo sobre as frações organo-minerais do solo**

A composição e o grau de associação da MO com os constituintes minerais do solo, em suas diferentes frações, determinam a magnitude do efeito do manejo sobre essas frações ao longo do tempo. Bayer (1996) observou que a taxa de decomposição média da MO nas frações > 53 m foi 4,5 e 3,4 vezes superior a das frações < 53 m, no PC e PD, respectivamente, para um ARGISSOLO VERMELHO. Tiessen & Stewart (1983) verificaram uma perda de 43% do C da fração > 53 m, em quatro anos de cultivo de um solo anteriormente sob pastagem nativa em clima temperado. Esta perda inicial foi atribuída à desintegração física da MO leve, com parcial incorporação nas frações de tamanho de partícula mais finas. No entanto, com o cultivo continuado por 60 anos, houve uma perda líquida de 34% de C e 29% de N do solo inteiro, com perdas importantes de MO nas frações silte e argila, indicando que o manejo do solo pode também afetar as frações mais humificadas da MO.

Seguindo o modelo de dinâmica da MO no solo, formulado por Mielniczuk (1999), a rápida perda inicial de C da fração  $>53$  m no trabalho de Tiessen & Stewart (1983) está relacionada, provavelmente, à redução nas adições de C ao sistema (compartimentos "A" e "B") pela colheita, à erosão e, por outra via, ao aumento da taxa de decomposição da MO grosseira pelo revolvimento do solo. Com as reduções nas adições de C e da magnitude dos compartimentos "A" e "B", a estabilidade de agregados é reduzida e a MO protegida fisicamente no interior de agregados torna-se acessível aos microorganismos, que a utilizam como fonte de C, reduzindo não só o compartimento "C", mas também o compartimento "D", que representa a MO protegida fisicamente no interior dos agregados. Sob condições severas de degradação do solo, uma outra porção da MO que compõe o compartimento "D", a MO de proteção coloidal pode ser exposta aos microorganismos e usada como fonte de C, caso a introdução de C mais lábil, via compartimentos "A" e "B", não seja suficiente para atender a demanda microbiana. Esta interdependência entre os compartimentos da MO faz com que os fatores que controlam a magnitude das adições de C ao solo (sistema de cultura e de preparo do solo) sejam determinantes também do comportamento, à longo prazo, dos compartimentos C e D, responsáveis, em média, por 80% do COT dos solos com predomínio de minerais de carga variável (Pillon et al., 1999, Pillon, 2000).

Martin et al. (1990) avaliaram a taxa de perda da MO em um solo de savana, através da alteração da vegetação de gramíneas  $C_4$  para uma floresta de produção de madeira com plantas  $C_3$ , monitorando a alteração em  $^{13}C$ . A perda de C, na camada 0-10 cm, foi maior para a fração  $>53$  m (89-97%) do que para o silte (43 a 48%) e argila (47%), indicando que as frações mais grosseiras da MO são mais sensíveis ao manejo.

Nem sempre a substituição de um sistema natural (floresta) por um agroecossistema (pastagem cultivada) acarreta perdas na MO do solo. Desjardins et al. (1994) mostraram que, em dois solos da Amazônia, um sob floresta nativa e outro após 10 anos sob pastagem cultivada, o conteúdo de C foi similar até 40cm de profundidade. Provavelmente, a maior adição de C ao solo na pastagem, via sistema radicular das gramíneas (Balesdent & Balabane, 1996), tenha contribuído para a manutenção da MO do solo ao longo do tempo, mesmo após a perturbação do sistema natural. O fracionamento físico da MO por tamanho de partícula mostrou que as mudanças foram restritas à camada 0-10 cm e que a substituição do C original da floresta ( $C_3$ ) pelo C da pastagem ( $C_4$ ), foi maior na fração areia (55-65% do C total) do que na argila (34-45% do C total). Estes resultados sugerem que o C do solo é afetado pelo



manejo em todas as frações de tamanho de partícula, independente se ocorre incremento ou perda de MO da fração. Vitorello et al. (1989) já haviam observado maior substituição de C nas frações mais grosseiras do que nas mais finas.

A proporção da fração leve ou grosseira em relação à MO total do solo é afetada pelo manejo, clima e outros fatores que influem no balanço entre a produção de resíduos e sua decomposição. Em regiões de clima temperado, as baixas temperaturas favorecem o acúmulo de resíduos vegetais no solo, os quais podem representar até 50% da MO total (Franzluebbbers & Arshad, 1997). Nos solos de regiões tropicais, as elevadas temperaturas e umidade favorecem a decomposição da MO grosseira, limitando seu acúmulo. Geralmente, a MO grosseira representa 20% da MO total do solo nesses ambientes (Bayer, 1996; Pillon, 2000). Assim, a elevada importância atribuída a estas frações para a ciclagem de nutrientes em regiões temperadas (Christensen 1992; Parton et al., 1987) pode ser menor nas regiões tropicais. Assumindo que nas regiões tropicais e subtropicais, 80% do COT do solo está presente nas frações < 53  $\mu$ m e que a taxa de decomposição da MO das frações mais grosseiras é cerca de 4 vezes superior a do compartimento mais humificado (MO nas frações silte e argila) (Bayer, 1996), a quantidade de nutrientes que pode ser liberada, em um certo tempo, pelas duas frações, pode ser considerada similar. Além disso, a alta relação C/N (20-40) e a baixa concentração de nutrientes, especialmente N e P, das frações mais leves da MO, podem provocar a imobilização temporária de nutrientes na biomassa microbiana, em detrimento da absorção pelas plantas (Janzen et al., 1992). Entretanto, a MO grosseira ou leve representam um compartimento temporário no solo, cuja redução drástica pode ser prejudicial à qualidade do solo, devido a sua importância na estabilização de agregados e ao suprimento de compostos orgânicos para os compartimentos mais estáveis da MO.

De acordo com o modelo hierárquico de formação de agregados (Tisdall & Oades, 1982), os macroagregados são formados pela reunião de microagregados, os quais estão presentes em todas as classes de agregados. Como consequência, a distribuição das partículas primárias (areia, silte e argila) é similar para todas as classes de agregados > 0,05 mm (Balabane, 1996). Assumindo que os agentes ligantes temporários e transitórios (MO inter-microagregados) conferem estabilidade aos macroagregados e representam um compartimento de C lábil, de fácil acesso aos microorganismos, pode-se sugerir que a mineralização de C e N nos macroagregados é mais rápida do que nos microagregados (Elliott, 1986).

Balabane (1996) investigou a ciclagem de N associado a fração argila em diferentes classes de tamanho de agregados em um solo previamente incubado com material  $^{15}\text{N}$  marcado. Os resultados indicaram que a mineralização de N associado à fração argila foi relacionada às diferentes posições ocupadas dentro da estrutura do solo, com maior mineralização do nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) previamente imobilizado na argila presente nos macroagregados, enquanto o nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) associado com argila nos microagregados foi rapidamente seqüestrado, provavelmente, pela sua localização em poros inacessíveis aos microorganismos.

A avaliação dos efeitos do manejo sobre as frações de tamanho de partícula da MO ao longo do tempo tem indicado que todas as frações são afetadas, embora os maiores efeitos relativos sejam observados sobre as frações mais grosseiras (Vitorello et al., 1989; Christensen, 1992; 1996; Pillon, 2000). Em função da ciclagem mais lenta de C e de N nos microagregados, os resultados de Balabane (1996) podem indicar que as alterações de C e N nas frações silte e argila, obtidas pela dispersão do solo inteiro, estejam diretamente relacionadas às respectivas alterações destas frações somente nos macroagregados. Neste caso, a relação entre o efeito do manejo sobre as frações mais estáveis da MO no solo (MO ligada às frações silte e argila) e a estabilidade da MO no interior dos microagregados deve ser interpretada com cautela. O fracionamento físico da MO por tamanho de partícula em cada classe de agregados do solo poderia auxiliar na definição dos efeitos do manejo sobre a MO localizada nos macro e microagregados.

Quando os solos das regiões tropicais e subtropicais são revolvidos, as perdas de MO são elevadas. Em contraste, quando solos de regiões temperadas são cultivados, as taxas de mineralização da MO raramente excedem a 50% do COT em 50 a 100 anos de cultivo. Shang & Tiessen (1997) observaram perdas de 14% do C e do N original do solo após seis anos de cultivo manual de um OXISSOLO da região semi-árida de Pernambuco. Neste solo, a MO contida na fração areia representou 22% do COT e apresentou um decréscimo de 40% em 6 anos. Menores efeitos foram observados sobre as frações silte e argila. Embora tenha havido transferência de MO da fração grosseira para as frações mais finas, a maior estabilidade da MO na fração argila foi relacionada a sua associação com óxidos de Fe de baixa cristalinidade.

De acordo com as observações existentes sobre a dinâmica da MO em suas frações no solo, as alterações pelo manejo poderiam ser assim resumidas. Inicialmente, nos sistemas com baixa adição de resíduos, ocorre uma rápida mineralização de MO das frações mais lábeis ( $> 53 \mu\text{m}$ ). Se o revolvimento do solo persiste ou a adição de resíduos é pequena, a perda de estabilidade de agregados é acentuada e a MO inter-microagregados é mineralizada. Os produtos desta mineralização inicialmente são incorporados nas frações mais finas (silte e argila) e um pequeno decréscimo é observado nos primeiros anos nestas frações. Se a entropia do sistema aumenta ainda mais, os conteúdos de C e de N do compartimento "D" (MO de proteção física e coloidal) são reduzidos, devido à perda de estabilidade dos agregados. Este processo de perda continua até que a atividade microbiana seja reduzida a níveis muito baixos. Este poderia ser o limite entre a MO biologicamente ativa e a MO passiva (Parton et al., 1987). Neste caso, o sistema atinge um novo estado estável, mas com conteúdo muito baixo de MO. Por outro lado, quando as adições de C ao sistema são maiores que as perdas, inicialmente ocorre acúmulo de MO nas frações mais lábeis, com incremento da estabilidade de agregados. Nos solos de carga variável, mas de textura arenosa, a macroagregação pode ser o principal fator de estabilização da MO, enquanto que nos solos mais oxidicos e argilosos, ocorre a rápida formação de microagregados, onde grande parte da MO pode ser protegida fisicamente em poros inacessíveis aos organismos.

### **Caracterização qualitativa da matéria orgânica do solo**

Diversos tipos de espectroscopias têm sido utilizadas para a caracterização qualitativa da MO do solo. A seguir, a espectroscopia de EPR e a RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS são descritas em detalhes.

### **Ressonância paramagnética eletrônica - EPR**

Os materiais orgânicos e as SHs apresentam radicais livres orgânicos em sua estrutura, os quais podem estar envolvidos em processos químicos, bioquímicos e fotoquímicos no solo. Os radicais livres e os metais paramagnéticos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{V}^{4+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ) possuem um ou mais elétrons desemparelhados e podem produzir sinais de EPR.

As SHs representam a fração mais importante da MO do solo e os íons metálicos paramagnéticos estão envolvidos em praticamente todos os processos que ocorrem no solo. A espectroscopia de EPR é não-destrutiva e pode fornecer informações sobre: a) a natureza e concentração de radicais livre presentes nas moléculas orgânicas e suas mudanças em função de fatores ambientais e de sua interação com o meio e b) o tipo e a simetria dos sítios de coordenação, a identificação dos átomos e grupos ligantes e as formas e estabilidade dos ligantes envolvidos na associação de SHs com metais paramagnéticos (Senesi, 1990a).

O fenômeno básico que suporta a espectroscopia de EPR é o efeito Zeeman, o qual envolve a interação entre o spin de um elétron desemparelhado e um campo magnético externo. O sinal de EPR resulta da absorção de energia de uma onda eletromagnética incidente, a qual induz a transição de uma molécula de um estado de menor energia para um de maior energia.

Na ausência de um campo magnético, o momento magnético  $\vec{\mu}$  de um elétron desemparelhado pode ser expresso em termos de seu spin ( $\vec{s}$ ) como:

$$\vec{\mu} = -g \beta \vec{s}$$

onde  $\beta$  é o magnéton de Bohr e  $g$  é o fator giromagnético do elétron (2,00232 para o elétron livre). Aplicando-se um campo magnético constante  $H$  sobre o sistema, haverá uma interação entre o campo e o momento magnético  $\mu_z$ , semelhante a que existe entre um campo e uma barra magnetizada. Neste último caso, o ímã poderá tomar qualquer orientação em relação ao campo  $H$ , tendo, conseqüentemente, uma variação de valores de energias possíveis.

No caso do elétron num campo magnético, estas energias estão quantizadas. Como  $S = 1/2$  para o elétron, há duas orientações permitidas para o spin, chamadas de paralela (estado  $M_s = 1/2$ ) ou de anti-paralela ao campo  $H$  (estado  $M_s = -1/2$ ). Se o campo magnético for aplicado na direção  $Z$ , teremos dois valores possíveis de energia,  $E(1/2) = +1/2 g\beta H$  e  $E(-1/2) = -1/2 g\beta H$ . A diferença de energia entre estes dois níveis é:

$$\Delta E = 1/2 g\beta H - (-1/2 g\beta H) = g\beta H$$

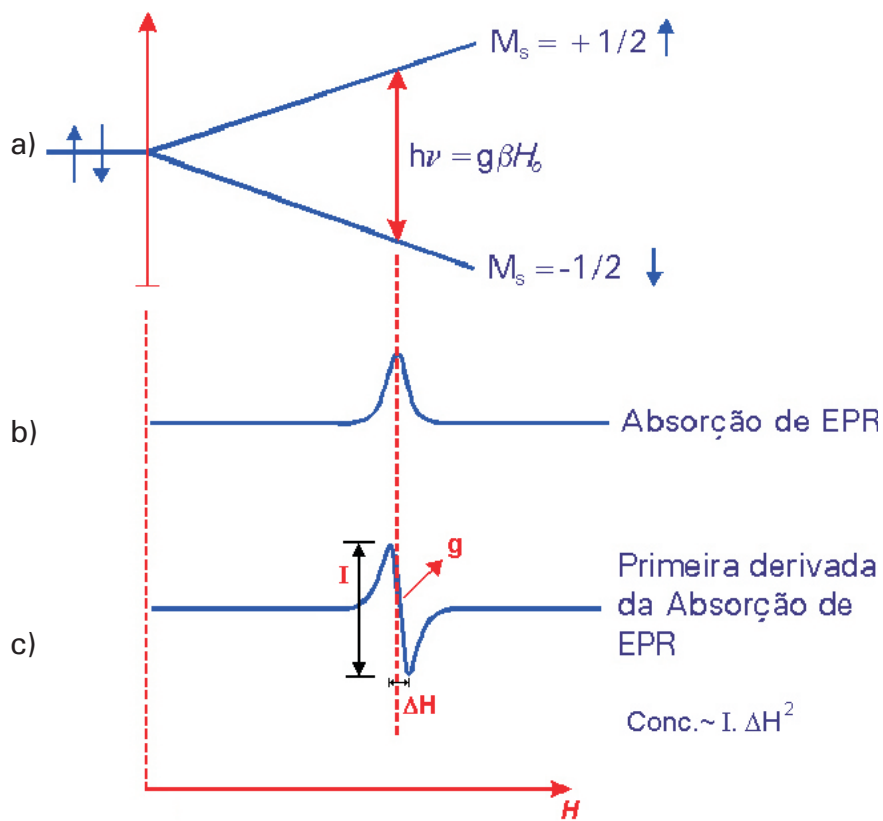
Na Figura 2 é representado o efeito Zeeman, o desdobramento dos níveis de energia, a forma de linha de absorção e a primeira derivada da linha de absorção de EPR. A transição entre os dois níveis ocorrerá quando uma energia  $\Delta E = g\beta H$  for fornecida ao sistema. Quando a condição de ressonância é satisfeita, o momento magnético sofre uma transição de uma posição paralela ao campo magnético  $H$  para uma posição anti-paralela a este. A energia  $\Delta E$  normalmente é fornecida ao sistema através da exposição a um campo de microondas de frequência fixa, perpendicular ao campo  $H$ , que é variado até que ocorra a transição (Senesi, 1990a).

Para um campo de 3400 Gauss, esta energia de transição é de  $0,32 \text{ cm}^{-1}$  ( $0,039 \text{ meV}$ ), portanto, uma radiação de microondas na banda X (frequência  $9,5 \text{ GHz}$ ,  $\lambda = C/V = 3 \text{ cm}$ ) será suficiente para provocar transições entre o estado  $M_s = +1/2$  e  $M_s = -1/2$ . Um campo magnético oscilante de frequência (o campo de microondas), perpendicular ao eixo Z, poderá induzir transições entre estes dois níveis se a energia do fóton  $h$  corresponder exatamente à separação de energia  $\Delta E$ , a qual satisfaz a condição de ressonância.

A absorção líquida de energia e, portanto, a detecção do sinal, somente pode ocorrer se a população de spins do nível inferior de energia é mantida em maior número que a do nível superior. A equação de Boltzmann mostra que, a qualquer temperatura  $T$ , existe uma diferença na população de spins em favor do menor nível energético:

$$N_+/N_- = \exp(-g\beta H_0/kT)$$

onde  $N_+/N_-$  correspondem ao número de elétrons no estado de energia mais alto ( $M_s = +1/2$ ) e mais baixo ( $M_s = -1/2$ ), e  $k$  é a constante de Boltzmann. Para manter esta diferença de população, os elétrons promovidos ao nível mais alto de energia, pela absorção de radiação, retornam rapidamente ao nível mais baixo, pela perda de energia para a vizinhança (processo de relaxação spin-rede). Se os tempos de relaxação são longos, a alta intensidade de radiação tende a igualar o número de spins em ambos os níveis, ou seja, ocorre a saturação do sistema de spin (efeito da saturação de potência). Isto causa um alargamento homogêneo do sinal, com perda de resolução da linha e redução ou perda da absorção líquida de energia, isto é, a intensidade do sinal (Senesi, 1990a).



**Figura 2.** a) Efeito Zeeman: desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético; b) forma da linha de absorção de energia do campo de microondas; c) primeira derivada da linha de absorção.

As frações da MO do solo fornecem espectros de EPR caracterizados por linhas de ressonância típicos de radical livre semiquinona. Nas SHs, um sistema doador-aceptor de elétrons envolvendo quinonas e hidroquinonas é, provavelmente, o mecanismo responsável pela geração e manutenção dos radicais livre semiquinona (Steelink & Tollin, 1985; Senesi, 1990a). Nas substâncias não-húmicas, outros compostos como hidroxil-antraquinonas, taninos, melaninas, pigmentos e lignina apresentam grupos quinona e fenólicos, ou seja, um potencial sistema doador-aceptor de elétrons (Steelink & Tollin, 1985) e também podem dar origem à radicais livre na MO do solo.

A concentração de elétrons desemparelhados (radicais livre ou spins  $g^{-1}$ ) de uma substância é, provavelmente, a informação mais importante que pode ser obtida de um espectro de EPR. Geralmente, a concentração de radicais livre semiquinona aumenta na ordem  $AF < AH < humina$ . A alta concentração de radicais livre semiquinona de SHs tem sido associada com baixa percentagem de H, baixas razões atômicas H/C e O/C, baixa razão  $E_4/E_6$ , coloração escura e alto grau de aromaticidade (Senesi, 1990a; Stevenson, 1994). Geralmente, a concentração de radicais livre aumenta com o avanço do grau de humificação da MO do solo (Senesi, 1990a; b; Martin-Neto et al., 1998; Bayer et al., 2000).

Num espectro típico de radical livre semiquinona (Figura 2 c) de SHs, sua concentração é estimada pela comparação da área do sinal de EPR da amostra com uma amostra padrão, com concentração de spins conhecida (Strong Pich), assumindo que a área sob a linha de absorção de EPR, obtida por dupla integral ou pelo produto da altura (I) e a largura de linha da primeira derivada do sinal de EPR ao quadrado ( $H^2$ ), é diretamente proporcional ao número de centros paramagnéticos que contribuem para o sinal (Senesi, 1990a).

Além da possibilidade de quantificação, um espectro de EPR fornece outros parâmetros importantes para a caracterização da natureza e origem dos radicais livre: o valor  $g$ , a largura de linha de absorção ( $\Delta H$ ) e, eventualmente, a estrutura hiperfina. O valor  $g$  pode fornecer informações sobre a natureza química do radical livre e pode ser calculado a partir da magnitude do campo magnético onde ocorre a ressonância da amostra e de um padrão, com valor  $g$  conhecido, normalmente, N,N-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH diluído em KCl) ( $g_{DPPH} = 2,0036$ ). Os valores  $g$  normalmente verificados para AH e AF variam entre 2,0032-2,0051 (Senesi, 1990a). A largura da linha de absorção é medida diretamente no espectro da primeira derivada do sinal de absorção, obtido por uma única varedura do campo magnético. A largura de linha está relacionada

ao grau de liberdade da molécula no meio e ao grau de interação com moléculas vizinhas.

A quantificação de radicais livre semiquinona deve ser realizada a partir de um espectro de EPR onde a potência de microondas utilizada não provoque a saturação do sinal de absorção. Esta informação é fornecida pela curva de saturação de potência da amostra, onde relaciona-se a raiz quadrada da potência com a intensidade do sinal. A saturação da amostra ocorre quando a linearidade entre esses dois parâmetros deixa de existir. As curvas de saturação de potência também fornecem informações sobre a interação dos centros paramagnéticos com moléculas vizinhas (por exemplo metais paramagnéticos e a matriz mineral do solo), pois estas interações afetam o tempo de relaxação dos spins. Mais detalhes sobre a técnica de EPR e a obtenção e interpretação dos parâmetros espectroscópicos podem ser obtidos em Senesi (1990a).

A proximidade dos radicais livre semiquinona com outros centros paramagnéticos pode resultar em alterações na forma de linha, largura e intensidade do sinal detectado por EPR, principalmente devido aos efeitos sobre os tempos de relaxação spin-rede. Quando uma amostra, por exemplo, apresenta alta concentração de  $Fe^{3+}$ , a linha de ressonância do Fe pode sobrepor completamente o sinal do radical livre, tornando inviável a sua quantificação.

Entretanto, alguns solos permitem a realização de experimentos de EPR diretamente nas frações organo-minerais. Martin-Neto et al. (1994) avaliaram o grau de humificação da MO associada às frações granulométricas  $> 150 \mu m$ ,  $150-100 \mu m$ ,  $100-53 \mu m$ ,  $53-20 \mu m$ ,  $20-2 \mu m$  e  $< 2 \mu m$  de um MOLISSOL da Argentina usando EPR e observaram um acentuado aumento do grau de humificação da MO nos complexos organo-minerais  $< 53 \mu m$ , sugerindo que estas frações são as mais estáveis da MO. A fração  $2-20 \mu m$  apresentou maior grau de humificação (maior conteúdo de radicais livre semiquinona), sendo pouco afetada pelas práticas agrícolas.

Em um experimento de longa duração, Bayer et al. (2000) avaliaram o efeito de sistemas de cultura, após 12 anos sob PD, sobre o conteúdo e a qualidade da MO da camada 0-2,5 cm do solo, medidos através do grau de humificação da MO em agregados organo-minerais e na fração AH. Os resultados indicaram menor grau de humificação da MO de amostras de agregados organo-minerais  $< 53 \mu m$  e dos AHs dos sistemas com maior adição de resíduos vegetais,



indicando um caráter menos condensado, mais alifático das substâncias orgânicas adicionadas ao solo pelos sistemas de cultura, quando comparado à MO nativa do solo. A correlação significativa e positiva entre o grau de humificação dos AHs, determinado por EPR, e a aromaticidade, determinada por RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS, indica a utilidade da concentração de radicais livre semiquinona como um indicador qualitativo do grau de humificação das Shs.

### **Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ com polarização cruzada e ângulo mágico do spin (RMN $^{13}\text{C}$ CP/MAS)**

A espectroscopia de RMN é uma das mais poderosas ferramentas disponíveis para a caracterização estrutural da MO e seus processos de humificação em solos (Preston, 1996; Köegel-Knabner, 1997). Sua aplicação possibilita a utilização de materiais em estado sólido, líquido ou intermediários, como géis e colóides, e a observação de inúmeros núcleos como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{31}\text{P}$  e  $^{23}\text{Na}$ .

#### **Princípios da técnica de RMN $^{13}\text{C}$ CP/MAS**

Diversas publicações recentes (Fründ & Lüdemann, 1989; Kinchesh et al., 1995; Preston, 1996; Köegel-Knabner, 1997, Conte et al., 1997a; b) têm enfatizado os princípios físicos e químicos básicos desta técnica, os parâmetros utilizados nos experimentos de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS e as possibilidades e limitações da RMN em estado líquido e sólido, principalmente dos núcleos  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ . Nesta publicação, somente uma síntese da teoria da RMN será descrita, com ênfase as suas limitações e potencialidades para o estudo da dinâmica da MO no solo.

Todos os núcleos possuem carga. Em alguns núcleos, como por exemplo,  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , a carga gira em torno do eixo nuclear gerando um dipolo magnético. O momento angular da carga em movimento pode ser descrito em termos de seu número de spin ( $I$ ), que pode assumir os valores de 0, 1/2, 1, 3/2, etc.... Quando  $I=0$ , o núcleo não apresenta rotação em torno do seu eixo. A magnitude do dipolo gerado é expressa em termos do momento magnético nuclear,  $\mu$ . O número de spin  $I$  determina as orientações que um núcleo pode assumir em um campo magnético externo, de acordo com a expressão  $2I + 1$ . Para  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ ,  $I=1/2$ , assim, duas orientações ou níveis de energia são possíveis ( $-1/2$  e  $+1/2$ ), com pequeno excesso de população na orientação de menor energia ( $+1/2$ ).

Sob a influência de um campo magnético externo,  $H_0$ , o eixo magnético do núcleo terá um movimento de precessão ao redor do eixo do campo, semelhante a um pião sob a influência do campo gravitacional. Quando a radiação eletromagnética é aplicada para gerar um segundo campo giratório,  $B_1$ , a um certo ângulo externo ao campo magnético  $H_0$ , a molécula absorve energia. Quando a frequência se iguala a frequência de precessão, o núcleo entra em ressonância e produz um sinal, que é amplificado e gravado.

A equação fundamental da RMN relaciona a frequência da radiação eletromagnética ( $\nu$ ) com a força do campo ( $H_0$ ):

$$\nu = \frac{\gamma H_0}{2\pi}$$

Onde  $\gamma$  é a razão giromagnética, constante para um determinado núcleo. A razão giromagnética é a constante de proporcionalidade entre o momento magnético  $\mu$  e o número de spin  $I$ .

$$\gamma = \frac{2\pi\mu}{hI}$$

onde  $h$  é a constante de Planck.

Como os valores obtidos para  $\nu$  são dependentes da força do campo magnético, os resultados dos experimentos de RMN, para serem comparados, são expressos em termos de deslocamento químico relacionado a uma referência padrão. Assim, o deslocamento químico ( $\delta$ ) é dado por:

$$\delta = \frac{\nu \text{ amostra} - \nu \text{ referência}}{\nu \text{ referência}} \times 10^6$$

#### Limitações da RMN $^{13}\text{C}$ CP/MAS para estudos da matéria orgânica do solo

A espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  é empregada no estado líquido e sólido para obter-se informações estruturais dos núcleos de  $^{13}\text{C}$  e sobre o percentual relativo de C em cada fração orgânica analisada (Conte et al., 1997b). A RMN  $^{13}\text{C}$  no estado líquido tem sido aplicada para amostras orgânicas oriundas de solo e de plantas com algum sucesso (Fründ & Lüdmann, 1989; Preston, 1996).

A RMN  $^{13}\text{C}$  no estado sólido possibilita a caracterização química direta de materiais orgânicos presentes no solo inteiro, em frações organo-minerais ou nas SHs. Suas primeiras aplicações em solos resultaram em espectros com linhas de ressonância largas, devido à forte interação dipolar  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e à anisotropia do deslocamento químico. No entanto, com o surgimento das técnicas de polarização cruzada (CP) e ângulo mágico de spin (MAS), tem sido possível obter espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  no estado sólido de alta resolução. Resumidamente, a técnica de CP possibilita a transferência de magnetização dos núcleos de  $^1\text{H}$ , mais abundantes na amostra, para os diluídos núcleos de  $^{13}\text{C}$ , levando a um considerável aumento de sinal (Wilson, 1987). Na técnica de MAS, a amostra gira em alta velocidade em torno do ângulo mágico ( $54,7^\circ$ ), o que possibilita compensar a anisotropia do deslocamento químico em amostras sólidas.

Quando não há saturação, a intensidade de um sinal de RMN (área sob o sinal) é diretamente proporcional à concentração do grupo orgânico responsável pelo sinal. A posição no espectro onde um núcleo entra em ressonância é chamada de deslocamento químico e fornece informações sobre o ambiente químico das vizinhanças do núcleo. Os espectros de RMN, no estado líquido, possuem uma vantagem considerável pela alta resolução dos sinais. No estado sólido, a interação dipolar entre os núcleos  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , a anisotropia do deslocamento químico de C primários aromáticos e carboxílicos e a baixa relação sinal/ruído provocam o alargamento das linhas (Stevenson, 1994) e os tipos de C são identificados por regiões de deslocamento químico.

Devido à complexidade estrutural das amostras de compostos orgânicos humificados, as ressonâncias nos espectros de RMN são divididas em regiões que correspondem aos diferentes grupos funcionais presentes (Figura 3). Os principais sinais observados nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS são apresentados a seguir.

A região de 0-45 ppm representa o C-alquil; entre 45-110 ppm, aparece o C-O-alquil; C-aromático é representado na região 110-165 ppm e entre 165-190 ppm, aparece o C-carboxílico. Os principais sinais são observados a 30-33, 56-58, 73-75, 119, 130, 150 e 175 ppm. As ressonâncias entre 30-33 ppm originam-se de C metilênico em longas cadeias alifáticas de origem variada, como ácidos graxos, lipídios, cutina e outros biopolímeros alifáticos. Grupos metoxílicos na lignina e o C adjacente de grupos amina em proteínas aparecem ao redor de 58 ppm. O sinal proeminente próximo a 73 ppm é atribuído ao C oxigenado de carboidratos e é acompanhado pelo sinal a 105 ppm (C

dioxigenado - acetal) e do ombro ao redor de 62 ppm, o qual corresponde ao  $C_6$  ( $CH_2$ ) da estrutura de carboidratos. As ressonâncias ao redor de 119 e 130 ppm são atribuídas ao C-aromático H-substituído e ao C-aromático alquil-substituído, respectivamente. A presença de C-aromático O-substituído (C-fenólico) é indicada pelos sinais entre 145 e 156 ppm. A ressonância próxima a 175 ppm pode ser originada de C em grupos carboxílico, amida ou éster (Baldock et al., 1992; Golchin et al., 1994b; Guggenberger et al., 1995a; Kögel-Knabner, 1997).

Embora a RMN  $^{13}C$  CP/MAS possibilite a análise da MO *in situ*, existem limitações que se refletem sobre a quantificação dos diferentes tipos de C contidos em uma amostra. A eficiência da CP não é a mesma para diferentes tipos de C. Em geral, C alifáticos possuem maior proximidade com hidrogênios e ganham intensidade mais rapidamente que C-aromáticos, especialmente aqueles em estruturas altamente condensadas (Kinchesh et al., 1995; Preston, 1996).

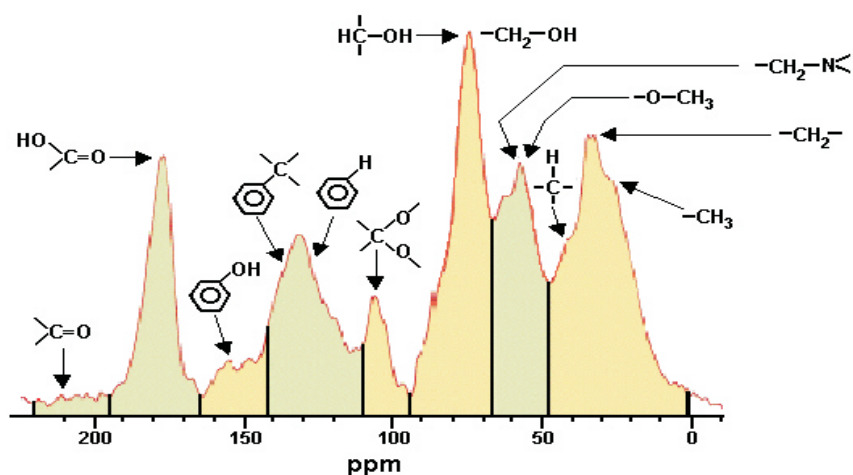


Figura 4.5.2 Espectro de RMN de  $^{13}C$  típico de AH mostrando os grupos funcionais associados às bandas correspondentes (Skjemstad et al., 1998).

**Figura 3.** Espectro de RMN de  $^{13}C$  típico de AH, mostrando os grupos funcionais associados às bandas correspondentes (Skjemstad et al., 1997).

A presença de espécies paramagnéticas na amostra podem reduzir a eficiência da polarização cruzada. Isto ocorre devido ao spin eletrônico da substância paramagnética reduzir a constante de tempo de relaxação spin-rede dos hidrogênios,  $T_1$  ( $^1\text{H}$ ), fazendo com que os  $^1\text{H}$  percam a magnetização muito rapidamente, deixando de transferi-la aos núcleos de  $^{13}\text{C}$ . Estes núcleos em proximidade a centros paramagnéticos podem ser invisíveis na RMN (Baldock et al., 1992; Skjemstad et al., 1994; Kinchesh et al., 1995; Preston, 1996; Kögel-Knabner, 1997; Smernick & Oades, 1999). Este efeito pode ser localizado, afetando grupos funcionais ou tipos de C específicos, ou pode ser mais geral, reduzindo a sensibilidade de todos os núcleos de C presentes. Neste caso, a quantificação poderá ser comprometida, se a perda da intensidade do sinal de  $^{13}\text{C}$  não seja igual para todos os tipos de C da amostra.

As principais espécies paramagnéticas presentes em amostras de solo e SHs são  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e radicais livre orgânicos. Nos solos brasileiros, o  $\text{Fe}^{3+}$  está presente em minerais primários e secundários e pode representar uma considerável fração da matriz mineral do solo. Por sua abundância, alta área superficial específica e reatividade, os óxidos de ferro interagem com grupos funcionais da MO (especialmente grupos carboxílicos e OH fenólico). Esta íntima associação de grupos orgânicos com Fe pode impedir que uma fração estrutural importante da MO do solo (C passivo) seja visível a RMN  $^{13}\text{C}$  de solo inteiro ou de frações organo-minerais.

Para Randall et al. (1995), o C detectado pela RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS em amostras de solo pode representar somente as frações mais dinâmicas da MO. Segundo Skjemstad et al. (1994), a porcentagem de C observado pela RMN é igual ou inferior a 30%. Além disso, o conteúdo de C nos solos brasileiros é baixo (inferior a 3%), o que limita o potencial desta técnica para estudos qualitativos da MO diretamente sobre amostras de solo inteiro ou em frações organo-minerais, sem procedimentos de extração, concentração ou purificação da MO do solo. Segundo Preston et al. (1994), amostras de solo ou frações que apresentam uma relação C/Fe < 1 fornecem espectros com baixa relação sinal/ruído e podem apresentar problemas na quantificação.

Em amostras pobres em C e com elevados teores de metais paramagnéticos, diferentes tratamentos têm sido sugeridos, os quais utilizam  $\text{SnCl}_2$ , ditionito de sódio ou ácidos fluorídrico e clorídrico, objetivando concentrar C na amostra e remover a interferência de metais paramagnéticos (Preston et al., 1994; Skjemstad et al., 1994; Dai & Johnson, 1999). A efetividade destes métodos tem sido avaliada pela remoção de  $\text{Fe}^{3+}$ , pelo aumento da razão sinal/ruído dos

espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , pela perda de massa e pelas alterações da composição química amostra.

Os tratamentos com ditionito de sódio e  $\text{SnCl}_2$  mostraram-se menos efetivos em remover materiais paramagnéticos e matéria mineral do que o tratamento com HF (Preston et al., 1994; Skjemstad et al., 1994; Dai & Johnson, 1999). Skjemstad et al. (1994) mostraram que o tratamento com HF 2% removeu Fe com mais eficiência do que a extração com ditionito e citrato. Sucessivos tratamentos removeram entre 79% e 95% do Fe total dos solos estudados. No estudo, a perda de C variou de 8% a 17% do C inicial, mas a avaliação de espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS, comparando amostras tratadas com HF 1% e 2% com suas referências, não mostrou nenhuma mudança significativa na distribuição da MO. Skjemstad et al. (1994) somente observaram pequenas perdas de carboidratos. Baseados nos resultados encontrados, os autores recomendaram o tratamento com HF 2% (m/m) para ser usado rotineiramente em pré-tratamento de solos para análise de RMN  $^{13}\text{C}$  na Austrália.

No entanto, Dai & Johnson (1999) avaliaram a eficiência da extração de Fe e o aumento na qualidade espectral por ditionito,  $\text{SnCl}_2$  e HF 2% e observaram que HF 2% resultou na maior remoção de Fe (45 a 99%), mas com importante remoção de C (12-67%) e de N (19-66%), sugerindo alguma alteração química da MO resultante do tratamento. Além disso, para os solos com altos teores de Fe, HF 2% e  $\text{SnCl}_2$  mostraram melhorias na qualidade espectral, mas os resultados foram inconsistentes. Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de solos extraídos com HF indicaram que os carboidratos e C de grupos carboxílicos foram removidos preferencialmente, indicando mudanças na estrutura da MO com a extração. Dai & Johnson (1999) concluíram que, apesar de um substancial acréscimo na relação C/Fe após tratamento com HF e  $\text{SnCl}_2$ , razoáveis espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  somente podem ser obtidos em amostras com relação C/Fe superior a 100, contrastando com prévios resultados obtidos por Preston et al. (1994).

Com base nesses resultados conflitantes, pesquisas adicionais são necessárias para estabelecer tratamentos de rotina, objetivando melhorar a qualidade espectral e das informações obtidas por RMN  $^{13}\text{C}$  em amostras de solo e de frações contendo baixos teores de C e altos conteúdos de metais paramagnéticos.

Apesar dos problemas descritos, a espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS pode fornecer muitas informações importantes sobre a estrutura da MO do solo. Em muitos estudos, é suficiente comparar as intensidades relativas dos diferentes tipos de C em amostras de mesma origem. Entretanto, a avaliação da distribuição dos diferentes tipos de C é normalmente semi-quantitativa. Dos parâmetros utilizados durante a aquisição de espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS, o mais crítico é o tempo de contato necessário para obter a CP entre o próton e o núcleo de  $^{13}\text{C}$ . Para a aquisição de espectros quantitativos, é necessária a realização de experimentos com tempos de contato variáveis, que possibilitem determinar o melhor tempo de contato para a aquisição de espectros para cada conjunto de amostras.

Conte et al. (1997a) realizaram experimentos com tempos de contato variáveis para um conjunto de amostras de AH e AF, extraídos e purificados de solos vulcânicos da Costa Rica e da Itália, e demonstraram que o tempo de contato ótimo foi variável de acordo com a origem e estrutura química da amostra. Os tempos de contato obtidos variaram desde 250 até 800 s. Estes valores são inferiores ao tempo de 1000 s utilizado na literatura para amostras húmicas (Preston, 1996). Para Conte et al. (1997a), a eficiência da polarização cruzada e, por conseguinte, do tempo de contato, é afetada não só pelo número de prótons, mas também por sua distribuição nas moléculas. A otimização dos tempos de contato pode reduzir pela metade a perda de sinal em espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS. Estes experimentos têm sido sugeridos por Preston (1996) e Kinchesh et al. (1995) e deveriam ser objeto de pesquisa para os grupos brasileiros que utilizam a espectroscopia de RMN na avaliação qualitativa da MO do solo.

### **Aplicações da RMN $^{13}\text{C}$ CP/MAS no estudo da matéria orgânica do solo**

A espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS tem sido utilizada para investigar possíveis mudanças estruturais na composição da MO, determinadas por alterações de uso e manejo no solo inteiro (Skjemstad et al., 1999), em frações de tamanhos de partícula (Preston et al., 1994; Guggenberger et al., 1995a), por densidade da MO (Baldock et al., 1992; Golchin et al., 1994a; b; Skjemstad et al., 1999), no acompanhamento da decomposição de resíduos vegetais no solo (Wershaw et al., 1996; Baldock et al., 1997; Skene et al., 1997a; b) e nas frações mais humificadas da MO (Preston, 1996; Bayer et al., 2000).

### Estudos de decomposição de resíduos usando RMN $^{13}\text{C}$

Estudos sobre a decomposição microbiana de resíduos orgânicos adicionados ao solo têm sido realizados visando observar mudanças na composição química dos compostos orgânicos durante esse processo. A decomposição pode ser definida como a alteração da estrutura química original de um composto orgânico ou tecido. No início, os organismos do solo decompõem as estruturas presentes nos resíduos de plantas que são mais disponíveis e que envolvem menor gasto de energia e, quando a decomposição avança, compostos com estrutura química mais recalcitrante tendem a acumular. A visão tradicional da decomposição e da humificação de resíduos orgânicos em solos inclui a perda de carboidratos e de proteínas, com acúmulo de SHs com alta proporção de C-aromático. Recentemente, a espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS e outras técnicas têm indicado que, com o avanço da decomposição, ocorre o acúmulo de C-alquil, enquanto que o C-aromático, possivelmente derivado da lignina, acumula inicialmente quando os polissacarídeos são utilizados, reduzindo seu conteúdo posteriormente (Baldock et al., 1992).

As transformações que ocorrem com os resíduos de plantas durante a sua decomposição no solo, comparando-se a seqüências como: tecido vegetal-fração leve (densidade  $< 1,7 \text{ g cm}^{-3}$ )-MO associada à fração areia ( $> 53 \text{ m}$ )-solo inteiro da camada 0-5 cm-solo inteiro da camada 30-50 cm, são freqüentes na literatura. Em geral, observa-se redução do conteúdo de carboidratos e aumento do conteúdo de C-alquil e aromático com o avanço da decomposição. Isto é interpretado pelos autores como o resultado da decomposição preferencial de carboidratos por microorganismos, enquanto o aumento na proporção de C-alquil na fração leve foi atribuído a produtos de origem microbiana, resultantes do processo de decomposição (Preston, 1996). Hopkins et al. (1997) também verificaram um aumento na proporção de C-alquil com o avanço da decomposição de folhas de *Lolium perenne* e isto foi atribuído ao acúmulo de produtos de origem microbiana e à preservação seletiva de C-alquil durante a decomposição.

O incremento no C-alquil e o decréscimo no C-O-alquil sugere que a relação C-alquil/C-O-alquil, determinada pela RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS, pode fornecer um índice sensível ao avanço da decomposição de resíduos orgânicos no solo. Baldock et al. (1997) caracterizaram o grau de decomposição de diversas frações orgânicas no solo, utilizando índices espectroscópicos e concluíram que as mudanças associadas ao conteúdo de C-aromático foram variáveis e inconsistentes, sugerindo que a relação C-alquil/C-O-alquil representa um índice mais sensível para monitorar as alterações no grau de decomposição.



### **Aplicação da RMN $^{13}\text{C}$ CP/MAS em estudos de revolvimento do solo e decomposição da matéria orgânica**

O revolvimento do solo acelera a decomposição e geralmente resulta em uma perda rápida da MO do solo (Bayer, 1996). Avaliações qualitativas, utilizando RMN, sugerem que o revolvimento promove somente pequenas alterações na distribuição de grupos funcionais na MO do solo, apesar de haver perdas importantes no conteúdo de C do solo (Preston et al., 1994). Skjemstad et al. (1997) mostraram que um ULTISOL, após 8 anos de cultivo com cana-de-açúcar, apresentou somente pequenas mudanças no conteúdo de C-aromático, embora o conteúdo de COT tenha reduzido de 6,3% para 4,2% durante este período. Em outro solo, originalmente sob pastagem nativa, cultivado durante 50 anos com cana-de-açúcar, também foram observadas pequenas mudanças qualitativas na MO, exceto para um pequeno aumento na proporção de C-O-alquil, o qual foi atribuído à grande adição de resíduos vegetais pela cana-de-açúcar ao solo (Skjemstad et al., 1997).

### **Aplicação da RMN $^{13}\text{C}$ CP/MAS em frações físicas de tamanho de partícula e densidade**

A caracterização estrutural de frações de tamanho de partícula da MO por RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS tem indicado um incremento no conteúdo de C-alquil e um decréscimo no C-O-alquil e C-aromático, passando da fração areia para as frações mais finas, sugerindo que existe um aumento do grau de humificação da MO do solo na ordem areia-silte-argila (Christensen, 1992; Guggenberger et al., 1995b). Baldock et al. (1992) avaliaram a composição química da MO presente nas frações areia, silte e argila, em cinco solos de vários ambientes e propuseram um modelo de decomposição da MO do solo. Segundo os autores, a MO se movimenta na ordem areia-silte-argila. Em todos os solos, o conteúdo de C-alquil aumentou com o decréscimo no tamanho de partícula, enquanto houve uma tendência de redução no C-O-alquil das frações maiores até a fração argila, sugerindo a perda preferencial de celulose e de hemicelulose dos resíduos de planta. Assim, durante a decomposição, carboidratos e proteínas são perdidos na transição do primeiro estágio ao intermediário, enquanto que os compostos aromáticos (lignina) aumentam e, na seqüência, decrescem em direção às partículas mais finas. Como resultado, a MO associada à fração argila é enriquecida em C-alquil recalcitrante e empobrecida em C-O-alquil, sugerindo que a razão C-alquil/C-O-alquil é mais consistente para determinar o grau de decomposição da MO em diferentes frações físicas. Resultados similares foram descritos por outros autores. Guggenberger et al. (1995b)

compararam a composição da MO do solo em frações de tamanho de partícula, em solos sob diferentes sistemas de uso e manejo e, em todos os solos, C-O-alkil e C-aromático decresceram na ordem areia-silte-argila, enquanto que o C-alkil aumentou nesta mesma ordem.

A separação da MO do solo em diferentes faixas de densidade tem sido utilizada para isolar frações da MO com diferentes graus de associação à matriz mineral e de estabilidade e, por consequência, com diferentes taxas de decomposição. Através da espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS, Golchin et al. (1994a) mostraram que a MO leve oclusa apresentou maior proporção de C-aromático e de C-alkil e menor conteúdo de C-O-alkil em relação à fração leve livre, um fato que pode ser resultado da utilização preferencial de carboidratos pelos microorganismos e da preservação seletiva de compostos de C mais recalcitrantes (C-alkil e C-aromático), associados aos resíduos vegetais de origem. No entanto, Baldock et al. (1990) mostraram que a síntese microbiana *in situ* pode ser a principal razão para o aumento na proporção de C-alkil com o avanço no grau de decomposição.

#### **Aplicação da RMN $^{13}\text{C}$ CP/MAS no estudo de substâncias húmicas**

Para solos minerais ricos em materiais paramagnéticos, a extração de SHs do solo é uma alternativa para o entendimento dos processos de humificação da MO no solo. Chen & Pawluk (1995) extraíram AHs de vários horizontes de dois solos em Alberta, Canadá, um sob vegetação rasteira e outro sob uma comunidade de floresta e plantas herbáceas. Os resultados de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS mostraram que a quantidade, a estrutura e a composição dos AHs variaram em função da profundidade do solo, sendo que as propriedades dos AHs sofreram maiores alterações quando sob vegetação de floresta e plantas herbáceas. Com o aumento da profundidade, os AHs apresentaram maior grau de aromaticidade.

Os estudos que relacionam a composição química de AHs com a qualidade e quantidade de resíduos vegetais adicionados ao solo por sistemas de cultura, especialmente sob PD, são escassos. Recentemente, Bayer et al. (2000) observaram relação estreita e inversa entre a quantidade de resíduos adicionada ao solo por sistemas de cultura e o grau de aromaticidade dos AHs, sugerindo a incorporação recente de compostos alifáticos às SHs do solo em sistemas sob elevada adição de resíduos vegetais.

### **Aplicação da RMN $^{13}\text{C}$ CP/MAS em conjunto com outras espectroscopias**

Skjemstad et al. (1993) utilizaram a foto-oxidação com alta energia de ultravioleta (UV) para remover as frações lábeis da MO externa aos agregados. A oxidação se processa sob luz ultra-violeta (UV) e excesso de oxigênio, suprido por bolhas de ar em uma amostra de solo dispersa, fazendo com que somente a MO exposta à luz, externa aos agregados, seja oxidada. A análise do material orgânico remanescente após a oxidação por RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS mostrou que o C protegido fisicamente é constituído principalmente por polissacarídeos e grupos alquil. Solos que sofrem queimadas freqüentes apresentam consideráveis quantidades de carvão finamente dividido (cinzas orgânicas), o que confere um caráter altamente aromático ao espectro (Skjemstad et al., 1999). Como o carvão é resistente à oxidação por luz UV, esta técnica possibilita diferenciá-lo da MO restante do solo. Esta técnica poderá ter especial interesse em áreas sob cultivo de cana-de-açúcar e nos solos sob cerrado nativo, no Planalto Central brasileiro, onde ocorrem queimadas freqüentes. Segundo Skjemstad et al. (1996), a presença de carvão representa uma importante contribuição para a ressonância observada a 130 ppm nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS em muitos solos australianos.

A espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS também tem sido combinada com EPR. Bayer et al. (2000) observaram uma relação significativa e direta entre o conteúdo de radicais livre semiquinona, detectado por EPR, e o grau de aromaticidade, detectado por RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS, confirmando a utilidade do nível de radicais livre semiquinona como indicador qualitativo das SHs.

### **Avaliação da dinâmica da matéria orgânica do solo pela abundância natural do $^{13}\text{C}$ ( $\delta^{13}\text{C}$ )**

A avaliação da dinâmica de longo prazo das frações da MO que possuem mais de 1000 anos pode ser realizada através da datação de C radiativo ( $^{14}\text{C}$ ) (Paul et al., 1997). Da mesma forma, estudos de mineralização de C em resíduos de plantas podem ser realizados por um ou dois anos, usando  $^{14}\text{C}$  marcado (Christensen & Sorensen, 1985). Em escalas intermediárias de tempo (1-50 anos), existem poucos dados sobre a dinâmica da MO no solo.

A medida de  $\delta^{13}\text{C}$  é uma técnica recente e tem sido usada como um marcador natural para estudos da dinâmica da MO no solo. Na natureza existem dois isótopos de C estáveis ( $^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ ), que compreendem 98,89% e 1,11% de todo C existente, respectivamente, resultando em uma  $^{13}\text{C}$  de -8‰ para o  $\text{CO}_2$  atmosférico (Nyberg et al., 2000). Todas as plantas discriminam  $^{13}\text{CO}_2$  durante a fotossíntese, mas o grau desta discriminação é função da via fotossintética. Plantas com via fotossintética  $\text{C}_3$  têm  $\delta^{13}\text{C}$  variando de -40 a -23‰ (valor mais freqüente -27‰), enquanto que as  $\text{C}_4$  têm valores de  $^{13}\text{C}$  variando de -9 a -19‰ (valor mais freqüente -12‰) (Smith & Epstein, 1971). Durante a fotossíntese, as plantas  $\text{C}_3$  discriminam  $^{13}\text{C}$  em maior grau que as plantas  $\text{C}_4$ . Em ecossistemas naturais, o carbono orgânico do solo é derivado quase que exclusivamente dos resíduos da vegetação nativa. Em agroecossistemas, duas origens são possíveis: uma remanescente da vegetação nativa e outra oriunda dos resíduos vegetais das plantas cultivadas. Os métodos analíticos convencionais não possibilitam identificar a origem do C presente na MO do solo, o que é possível usando-se técnicas isotópicas (Rao et al., 1994; Balesdent et al., 1998). O  $\delta^{13}\text{C}$  da MO é resultado da composição isotópica da vegetação da qual ela foi originada (Nadelhoffer & Fry, 1988). Esta concordância ocorre porque o fracionamento isotópico é negligível durante os estágios iniciais de decomposição da MO em solos bem drenados. Entretanto, a MO localizada abaixo de 20 cm da superfície do solo apresenta valores de  $^{13}\text{C}$  de 1-3‰ maiores do que aqueles encontrados na superfície (Nadelhoffer & Fry, 1988) e podem ser resultado de um novo fracionamento isotópico, o qual ocorre durante a decomposição de resíduos no solo, ou a um decréscimo de 1,5‰ no  $\delta^{13}\text{C}$  do  $\text{CO}_2$  atmosférico nos últimos 200 anos (Nadelhoffer & Fry, 1988; Agren et al., 1996). As variações na dinâmica isotópica de  $^{13}\text{C}$  da MO do solo com a profundidade são pequenas (2-3%), quando comparadas às variações causadas pela mudança na vegetação entre plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  (diferenças de 15‰).

A abundância do  $^{13}\text{C}$  em uma amostra é expressa como  $\delta^{13}\text{C}$  (‰), que é medida em relação a um padrão internacional. O padrão (PDB) é normalmente um carbonato proveniente de um fóssil, *Belemnitella americana*, da formação Pee Dee, da Carolina do Sul. A relação  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  do padrão é igual a aproximadamente 0,0112 (Conteh et al., 1997).

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ amostra} - ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ padrão})}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ padrão})} \times 1000$$

Assim, com base no princípio da diluição isotópica, as mudanças na  $^{13}\text{C}$  da MO do solo podem ser usadas, em alguns casos, para estimar a taxa de ciclagem da MO no solo em ambientes tropicais, subtropicais e temperados (Balesdent et al., 1998; Gregorich et al., 1995) e identificar a origem do C do solo (Rao et al., 1994; Nyberg et al., 2000). Isto é possível quando uma cobertura vegetal previamente estabelecida por longo tempo é substituída por outra de composição isotópica do  $^{13}\text{C}$  diferente. Por exemplo, quando uma área sob floresta tropical nativa (plantas  $\text{C}_3$ ) é convertida em área de produção de milho (planta  $\text{C}_4$ ), o C derivado da floresta (Cf) e o C derivado do milho (Cm) de qualquer camada de solo ou fração da MO, pode ser expresso como percentual do C total, pelas seguintes equações (Vitarello et al., 1989):

$$\text{Cm}(\%) = \frac{\delta - \delta_0}{\delta_c - \delta_0} \times 100 \quad \text{Cf}(\%) = 100 - \text{Cm}(\%)$$

onde  $\delta$  =  $\delta^{13}\text{C}$  do solo cultivado com milho;

$\delta_0$  =  $\delta^{13}\text{C}$  do solo sob floresta;

$\delta_c$  =  $\delta^{13}\text{C}$  média dos resíduos de milho;

Cm(%) = percentual de C derivado do milho;

Cf(%) = percentual de C derivado da floresta.

A transformação de um sistema natural em agroecossistema normalmente é seguida por um decréscimo dos conteúdos de C do solo, que é maior nos primeiros anos após a perturbação do sistema vigente. Na região de Piracicaba (SP), muitas áreas sob floresta ( $\text{C}_3$ ) foram transformadas em área de produção de cana-de-açúcar ( $\text{C}_4$ ). Vitarello et al. (1989) avaliaram as mudanças que ocorreram nos conteúdos de C do solo e no  $\delta^{13}\text{C}$  em áreas deflorestadas, convertidas à produção de cana-de-açúcar após 12 e 50 anos. A camada de 10-20 cm do solo foi separada em frações de tamanho de partícula. Os resultados mostraram que houve um decréscimo do conteúdo de C da floresta

(tempo 0) para 50 anos de cultivo com cana nas frações areia, mas não houveram mudanças na fração argila. O  $\delta^{13}\text{C}$  foi usada para estimar a proporção de C derivado da floresta e da cana-de-açúcar. O C derivado da cana representou 17,3% e 40,5% do COT após 12 e 50 anos de cultivo, respectivamente. A maior substituição de C da floresta ocorreu na fração areia grossa aos 12 anos de cana (67% C-C<sub>4</sub>), e diminuiu com a redução do tamanho de partícula, para 13,8% e 30,5% nas frações argila fina aos 12 e 50 anos, respectivamente, evidenciando uma dinâmica do C mais rápida nas frações de maior tamanho de partícula. Resultados semelhantes foram obtidos por Gregorich et al. (1995). Martin et al. (1990) mostraram que as maiores perdas de C devidas à transformação de uma savana nativa (plantas C<sub>4</sub>) em uma floresta de produção de madeira (C<sub>3</sub>), na camada 0-10 cm de solo, foram associadas às frações de tamanho de partícula > 50  $\mu\text{m}$  (89% a 97% de perda de C-C<sub>4</sub> em 16 anos).

A dinâmica da MO observada em classes de tamanho de agregados do solo tem comportamento semelhante ao observado para as frações de tamanho de partícula. Angers & Giroux (1996) determinaram as proporções de C jovem (< 15 anos) recentemente depositado em agregados estáveis em água usando  $\delta^{13}\text{C}$ . A área do experimento estava sob vegetação C<sub>3</sub> quando parcelas com silagem de milho contínuo (C<sub>4</sub>) e um sistema de rotação com milho e outras plantas C<sub>3</sub> foram estabelecidos. Após 15 anos, foram avaliados os conteúdos de C e o  $\delta^{13}\text{C}$  em cada classe de tamanho de agregados, obtendo-se a proporção de C derivado de plantas C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> (C jovem). Os resultados indicaram que a perda líquida de C derivado das plantas C<sub>3</sub> foi maior para os macroagregados maiores que 2 mm. Por outro lado, sob silagem de milho, os macroagregados estáveis em água foram enriquecidos em C-C<sub>4</sub> recentemente depositado, quando comparados aos microagregados e ao solo inteiro, compensando parcialmente as perdas de C-C<sub>3</sub> nativo. Em média, 20% do C em agregados estáveis em água > 1 mm foi derivado do milho, diminuindo para 9% no solo inteiro e 1% nos microagregados, mostrando que o C jovem adicionado ao solo acumula-se preferencialmente nos macroagregados estáveis em água e, provavelmente, desempenha um papel importante na sua estabilização, enquanto que em agregados de menor tamanho, a estabilização está mais relacionada a substâncias orgânicas mais humificadas e persistentes (Tisdall & Oades, 1982).

Por outro lado, Jastrow et al. (1996) encontraram resultados semelhantes e sugeriram que o C mais antigo dos microagregados tem um tempo de ciclagem maior do que nos macroagregados, indicando que o C dos microagregados pode ser fisicamente protegido e biologicamente recalcitrante. Estes resultados mostram que o uso da  $\delta^{13}\text{C}$  no estudo da dinâmica da MO em agregados é uma ferramenta poderosa para quantificar adições mais recentes de C e para estimar o tempo de ciclagem da MO nos micro e macroagregados do solo.

Muitos agroecossistemas estabelecidos após a derrubada de uma floresta ( $\text{C}_3$ ) contêm mais do que uma espécie de planta. Por exemplo, o estabelecimento de pastagem mistas, envolvendo leguminosas e gramíneas tem permitido melhores resultados aos agricultores do que em pastagens baseadas exclusivamente em gramíneas. Como as leguminosas são plantas  $\text{C}_3$ , a avaliação da sua contribuição para a MO do solo é complicada, pois o  $\delta^{13}\text{C}$  das leguminosas (-24 a -34‰) (Smith & Epstein, 1971) é similar àquele das árvores de floresta. Assim, para estimar a contribuição de leguminosas para a MO do solo em um sistema misto, Cadisch & Giller (1996) propuseram um modelo que pode ser aplicado desde que se disponha de uma parcela controle apropriada, isto é, uma área próxima onde uma pastagem de gramíneas tenha sido estabelecida simultaneamente à pastagem mista. Pelo modelo, a proporção de C derivado da leguminosa (Cl) na pastagem mista é expressa por:

$$\text{Cl (\%)} = \frac{1}{\delta_l - \delta_g} \left[ \delta_{lg} - \delta_g + \frac{C_g}{\text{Cl}_g} (\delta_g - \delta_G) \right]$$

Onde

$\delta_l$  =  $\delta^{13}\text{C}$  do tecido vegetal da leguminosa;

$\delta_g$  =  $\delta^{13}\text{C}$  do tecido vegetal da gramínea;

$\delta_{lg}$  =  $\delta^{13}\text{C}$  do solo sob pastagem mista;

$C_g$  = COT do solo sob pastagem de gramínea;

$\text{Cl}_g$  = COT do solo sob pastagem mista;

$\delta_G$  =  $\delta^{13}\text{C}$  do solo sob pastagem de gramínea.

O modelo proposto foi avaliado em solos amostrados em duas profundidades, sob somente pastagem de gramínea (*Brachiaria humidicola*), sob uma pastagem mista de gramínea (C<sub>4</sub>) e leguminosa (C<sub>3</sub>) (*B. humidicola* e *Desmodium ovalifolium*), ambas com seis anos, e sob uma floresta úmida (C<sub>3</sub>) na Bahia. A proporção de C do solo derivado da leguminosa na pastagem mista foi de 24%, na camada 0-2 cm, e de 10% na camada 5-15 cm. Na camada 0-2,5 cm, o C derivado da leguminosa foi responsável por 45% do C recentemente adicionado ao solo. Esta importante contribuição é resultado da participação da leguminosa em 30-50% do resíduo vegetal sobre o solo e do alto conteúdo de lignina e de polifenóis observado para o *D. ovalifolium*, os quais determinam uma decomposição mais lenta destes resíduos vegetais. Na camada de 5-15 cm, houve uma redução acentuada na contribuição de C oriundo das pastagens, o que confirma os resultados de Rao et al. (1994), segundo os quais a contribuição de uma leguminosa para o C do solo na camada 8-10 cm foi de 7%, enquanto que na camada 0-2 cm foi de 29% em uma pastagem mista com proporção de 37% de plantas leguminosas.

O método proposto por Cadisch & Giller (1996) assume que o C remanescente da floresta é o mesmo para a pastagem pura e para a mistura de gramíneas e leguminosas. Entretanto, este método só pode ser aplicado onde existe uma parcela controle adequada com mesmo histórico e manejo, isto é, uma pastagem constituída somente de gramínea. No modelo de Rao et al. (1994), a percentagem de C derivado das leguminosas em uma pastagem mista, é estimada pela fórmula:

$$CI (\%) = \frac{(\delta^{13}C \text{ solo past. mista} - \delta^{13}C \text{ solo past. Gram})}{(\delta^{13}C \text{ resíduo leg.} - \delta^{13}C \text{ resíduos gram.})} \times 100$$

Este modelo somente pode ser aplicado onde o conteúdo de COT do solo, sob o sistema puro e misto, é similar. Assim, quando o C sob o sistema misto é maior do que no sistema puro, o modelo subestima a contribuição das leguminosas e, por outro lado, o superestima quando o C do solo sob a pastagem pura é maior do que aquele do sistema misto. A partir destes modelos, pode-se estimar a contribuição das leguminosas para o C do solo em sistemas de cultura mistos, estabelecidos sobre uma vegetação anterior, desde que sejam atendidas as pressuposições exigidas pelos modelos.



O estudo da MO no solo esteve atrelado, por muitos anos, somente a aspectos relacionados à fertilidade do solo. Recentemente, a MO tem sido caracterizada como um dos principais determinantes da qualidade do solo, que tem sido definida como a capacidade do solo em manter a produtividade biológica e a qualidade ambiental e promover a saúde vegetal, animal e humana (Doran & Parkin, 1994).

Assim, a dinâmica da MO no solo está inserida dentro de um sistema aberto de elevada complexidade, onde só é possível compreender a sua função a partir de uma abordagem sistêmica, ou seja, a sua dinâmica é resultado da ação conjunta de todos os sistemas envolvidos. No ciclo do C, a MO do solo é um dos compartimentos. Sua magnitude depende da eficiência fotossintética do sistema de cultura (adição), da atividade dos organismos do solo responsáveis pela decomposição dos resíduos vegetais, dos fatores climáticos, dos mecanismos de sua estabilização e proteção (agregação, interação com a matriz mineral e composição química) e da ação antrópica, via manejo do solo. Todos estes sistemas estão relacionados, em algum grau, com a qualidade do ar (efeito estufa, camada de ozônio) e da água. A MO é um dos indicadores mais sensíveis a alterações dentro dos agroecossistemas e a avaliação da sua dinâmica ao longo do tempo, especialmente envolvendo suas frações, permite estabelecer práticas de manejo que resultem em maior qualidade para os sistemas envolvidos.

## Referências Bibliográficas

AGREN, G.I.; BOSATTA, E.; BALESSENT, J. Isotope discrimination during decomposition of organic matter: a theoretical analysis. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.60, p.1121-1126, 1996.

ANGERS, D.A.; GIROUX, M. Recently deposited organic matter in soil water-stable aggregates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.60, p.1547-1551, 1996.

BALABANE, M. Turnover of clay-associated organic nitrogen in the different aggregate-size classes of a cultivated silty loam. **European Journal of Soil Science**, Dordrecht, v.47, p.285-291, 1996.

BALDOCK, J.A.; OADES, J.M.; WATERS, A.G; PENG, X.; VASSALO, A.M; WILSON, M.A. Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v.16, p.1-42, 1992.

BALDOCK, J.A.; OADES, J.M.; VASSALLO, A.M; WILSON, M.A. Solid state CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of particle size and density fractions of a soil incubated with uniformly labelled  $^{13}\text{C}$ -glucose. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v.28, p.193-212, 1990.

BALDOCK, J.A.; OADES, J.M.; NELSON, P.N.; SKENE, T.M.; GOLCHIN, A.; CLARKE, P. Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v.35, p.1061-1083, 1997.

BALESSENT, J.; WAGNER, G.H.; MARIOTTI, A. Soil organic matter turnover in long-term field experiments as revealed by Carbon-13 natural abundance. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.52, p.118-124, 1988.

BALESSENT, J.; BALABANE, M. Major contribution of roots to soil carbon storage inferred from maize cultivated soils. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.28, n.9, p.1261-1263, 1996.

BALESSENT, J.; BESNARD, E.; ARROUAYS, D.; CHENU, C. The dynamic of carbon in particle-size fractions of soil in a forest-cultivation sequence. **Plant and soil**, The Hague, v.201, p.49-57, 1998.

BAYER, C. Dinâmica da matéria orgânica em sistemas de manejo de solos. Porto Alegre, 1996. 240 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C.A. Effect of no-till cropping systems on soil organic matter in a sandy clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. *Soil & Tillage Research*, Amsterdam, v.53, p.95-104, 2000.

CADISCH, G.; GILLER, K.E. Estimating the contribution of legumes to soil organic matter build up in mixed communities of C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> plants. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.28, n.6, p.823-825, 1996.

CAMBARDELLA, C.A.; ELLIOTT, E.T. Particulate soil organic matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.56, p.777-783, 1992.

CATROUX, G.; SCHNITZER, M. Chemical, spectroscopic, and biological characteristics of the organic matter in particle size fractions separated from an Aquoll. *Soil Science Society of American Journal*, Madison, v.51, p.1200-1207, 1987.

CHEN, Z.; PAWLUK, S. Structural variations of humic acids in two soils of Alberta Mollisols. *Geoderma*, Amsterdam, v.65, p.173-193, 1995.

CHRISTENSEN, B.T.; SORENSEN, L.H. The distribution of native and labelled carbon between soil particle size fractions isolated from long-term incubation experiments. *Journal of Soil Science*, London, v.36, p.219-229, 1985.

CHRISTENSEN, B.T. Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Advances in Soil Science*, New York, v.20, p.1-90, 1992.

CHRISTENSEN, B.T. Carbon in primary and secondary organomineral complexes. In: CARTER, M. R.; STEWART, B. A. (Ed.) *Structure and organic matter storage in agricultural soils*. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.97-165.

CONTE, P.; PICCOLO, A.; VAN LAGEN, B.; BUURMAN, P.; de JAGGER, P.A. Quantitative aspects of solid-state <sup>13</sup>C-NMR spectra of humic substances from soils of volcanic systems. *Geoderma*, Amsterdam, v.80, p.327-338, 1997a.

CONTE, P.; PICCOLO, A.; VAN LAGEN, B.; BUURMAN, P.; de JAGGER, P.A. Quantitative differences in evaluating soil humic substances by liquid and solid-state  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Geoderma*, Amsterdam, v.80, p.339-352, 1997b.

CONTEH, A.; LEFROY, R.D.B.; BLAIR, G.J. Dynamics of organic matter in soil as determined by variations in  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic ratios and fractionation by ease of oxidation. *Australian Journal of Soil Research*, Melbourne, v.35, p.881-890, 1997.

DAI, K.H.; JOHNSON, C.E. Applicability of solid-state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR analysis in Spodosols: chemical removal of magnetic materials. *Geoderma*, Amsterdam, v.93, p.289-310, 1999.

DESJARDINS, T.; ANDREUX, F.; VOLKOFF, B.; CERRI, C.C. Organic carbon and  $^{13}\text{C}$  contents in soils and soil size-fractions, and their changes due to florestation and pasture installation in eastern Amazonia. *Geoderma*, Amsterdam, v.61, p.103-118, 1994.

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and accessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BESDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Ed.) *Defining soil quality for sustainable environment*. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p.3-21. (Special Publication, 35)

ELLIOTT, E.T. Aggregate structure and carbon, nitrogen, and phosphorous in native and cultivated soils. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.50, p.627-633, 1986.

FELLER, C. Organo-mineral interactions in tropical soils. In search of "functional" organic matter pools: the particle-size fractionation approach. In: *ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS*, 3., 1999, Santa Maria. Anais... Santa Maria: UFSM, 1999. p.104-124.

FRANZLUEBBERS, A.J.; ARSHAD, M.A. Particulate organic carbon content and potential mineralization as affected by tillage and texture. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.61, p.1382-1386, 1997.

FRÜND, R.; LÜDEMANN, H.D. The quantitative analysis of solution- and CPMAS- $^{13}\text{C}$  NMR spectra of humic material. *The Science of the Total Environment*, Amsterdam, v.81/82, p.157-168, 1989.

GOLCHIN, A.; OADES, J.M.; SKJEMSTAD, J.O.; CLARKE, P. Study of free and occluded particulate organic matter in soils by solid state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectroscopy and scanning electron microscopy. *Australian Journal of Soil Research*, Melbourne, v.32, p.285-309, 1994a.

GOLCHIN, A.; OADES, J.M.; SKJEMSTAD, J.O.; CLARKE, P. Soil structure and carbon cycling. *Australian Journal of Soil Research*, Melbourne, v.32, p.1043-1068, 1994b.

GREGORICH, E.G.; ELLERT, B.H.; MONREAL, C.M. Turnover of soil organic matter and storage of corn residue carbon estimated from natural  $^{13}\text{C}$  abundance. *Canadian Journal of Soil Science*, Ottawa, v.75, p.161-167, 1995.

GREGORICH, E.G.; JANZEN, H.H. Storage of soil carbon in the light fraction and macroorganic matter. In: CARTER, M.R.; STEWART, B.A. (Ed.) *Structure and organic matter storage in agricultural soils*. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.167-211.

GUGGENBERGER, G.; ZECH, W.; HAUMAIER, L.; CHRISTENSEN, B.T. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: II. CPMAS and solution  $^{13}\text{C}$  NMR analysis. *European Journal of Soil Science*, Dordrecht, v.46, p.147-158, 1995a.

GUGGENBERGER, G.; ZECH, W.; THOMAS, R. Lignin and carbohydrate alteration in particle-size separates of a oxisol under tropical pastures following native savanna. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.27, n.12, p.1629-1638, 1995b.

HOPKINS, D.W.; CHUDEK, J.A.; WEBSTER, E.A.; BARRACLOUGH, D. Following the decomposition of ryegrass labelled with  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in soil by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Soil Science*, Dordrecht, v.48, p.623-631, 1997.

JANZEN, H.H.; CAMPBELL, C. A.; BRANDT, S.A.; LAFOND, G.P.; TOWNLEY-SMITH, L. Light-fraction organic matter in soils from long-term crop rotations. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.56, p.1799-1806, 1992.

JASTROW, J.D.; BOUTTON, T.W.; MILLER, R.M. Carbon dynamics of aggregate-associated organic matter estimated by carbon-13 natural abundance. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.60, p.801-807, 1996.

KINCHESH, P.; POWLSON, D.S.; RANDALL, E.W.  $^{13}\text{C}$  NMR studies of organic matter in whole soils: I. quantitation possibilities. *European Journal of Soil Science*, Dordrecht, v.46, p.125-138, 1995.

KÖGEL-KNABNER, I.  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. *Geoderma*, Amsterdam, v.80, p.243-270, 1997.

MARTIN, A.; MARIOTTI, A.; BALESSENT, J.; LAVELLE, P.; VUATTOUX, R. Estimate of organic matter turnover rate in a savanna soil by  $^{13}\text{C}$  natural abundance measurements. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.22, n.4, p.517-523, 1990.

MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A.E.; TRAGHETTA, D.G. Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a mollisol. *Soil Science*, Baltimore, v.157, n.6, p.365-372, 1994.

MARTIN-NETO, L.; ROSELL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperate grassland climosequence. *Geoderma*, Amsterdam, v.81, p.305-311, 1998.

MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. (Ed.) *Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Genesis, 1999. p.1-8.

NADELHOFFER, K.J.; FRY, B. Controls on Natural Nitrogen-15 and Carbon-13 abundances in forest soil organic matter. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.52, p.1633-1640, 1988.

NIEROP, K. Origin and fate of organic matter in sandy soils along a primary vegetation succession. 1999. 160f. Tese (Hoogleraar in de Bodemvorming en Ecopedologie) - Universitair Hoofddocent, Veenendaal, 1999.

NYBERG, G.; EKBLAD, A.; BURESH, R.; HÖGBERG, P. Respiration from  $\text{C}_3$  plant green manure added to a  $\text{C}_4$  plant carbon dominated soil. *Plant and Soil*, The Hague, v.218, p.83-89, 2000.

PARTON, W.J.; SCHIMEL, D.S.; COLE, C.V.; OJIMA, D.S. Analysis of factors controlling soil organic matter levels in great plains grasslands. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.51, p.1173-1179, 1987.

PAUL, E.A.; FOLLETT, R.F.; LEAVITT, S.W.; HALVORSON, A.; PETERSON, G.A.; LYON, D.J. Radiocarbon dating for determination of soil organic matter pool sizes and dynamics. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.61, p.1058-1067, 1997.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *European Journal of Soil Science*, Dordrecht, v.47, p.319-328, 1996.

PILLON, C.N.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L. Incremento da matéria orgânica particulada e associada a minerais por sistemas de manejo em solo Podzólico Vermelho-Escuro. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 3., 1999, Santa Maria. Anais... Santa Maria: UFSM, 1999. p.203-206.

PILLON, C.N. Alterações no conteúdo e qualidade da matéria orgânica do solo induzidas por sistemas de cultura em plantio direto. 2000. 232f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

PRESTON, C.M.; NEWMAN, R.H.; ROTHER, P. Using  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR to assess effects of cultivation on the organic matter of particle size fractions in a grassland soil. *Soil Science*, Baltimore, v.157, n.1, p.26-35, 1994.

PRESTON, C.M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Science*, Baltimore, v.161, n.3, p.144-166, 1996.

RANDALL, E.W.; MAHIEU, N.; POWLSON, D.S.; CHRISTENSEN, B.T. Fertilization effects on organic matter in physically fractionated soils as studied by  $^{13}\text{C}$  NMR: results from two long-term field experiments. *European Journal of Soil Science*, Dordrecht, v.46, p.557-565, 1995.

RAO, I.M.; AYARZA, M.A.; THOMAS, R.J. The use of carbon isotope ratios to evaluate legume contribution to soil enhancement in tropical pastures. *Plant and Soil*, The Hague, v.162, p.177-182, 1994.

SCHMIDT, M. W.; KNICKER, H.; HATCHER, P.; KÖGEL-KNABNER, I. Does ultrasonic dispersion and homogenization by ball milling change the chemical structure of organic matter in geochemical sample?-a CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR study with lignin. *Organic Geochemistry*, Elmsford, v.26, n.7/8, p.491-496, 1997.

SENESI, N. Application of electron Spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. *Advances in Soil Science*, New York, v.14, p.77-130, 1990a.

SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part I. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v.232, p.51-75, 1990b.

SHANG, C.; TIESSEN, H. Organic matter lability in a tropical oxissol: evidence from shifting cultivation, chemical oxidation, particle size, density, and magnetic fractionations. *Soil Science*, Baltimore, v.162, n.11, p.795-807, 1997.

SHANG, C.; TIESSEN, H. Organic matter stabilization in two semiarid tropical soils: size, density and magnetic separations. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.62, p.1247-1257, 1998.

SKENE, T.M.; SKJEMSTAD, J.O.; OADES, J.M.; CLARKE, P.J. The influence of inorganic matrices on the decomposition of *Eucalyptus* litter. *Australian Journal of Soil Research*, Melbourne, v.35, p.73-87, 1997a.

SKENE, T.M.; CLARKE, P.; SKJEMSTAD, J.O.; OADES, J.M. Browning reactions between *Eucalyptus* litter and different nitrogen sources. *Australian Journal of Soil Research*, Melbourne, v.35, p.1085-1091, 1997b.

SKJEMSTAD, J.O.; CLARKE, P.; TAYLOR, J.A.; OADES, J.M.; NEWMAN, R.H. The removal of magnetic materials from surface soils. A solid state <sup>13</sup>C CP/MAS n.m.r. study. *Australian Journal of Soil Research*, Melbourne, v.32, p.1215-1229, 1994.

SKJEMSTAD, J.O.; JANIK, L.J.; HEAD, M.J.; McCLURE, S.G. High energy ultraviolet photo-oxidation: a novel technique for studying physically protected organic matter in clay and silt-sized aggregates. *Journal of Soil Science*, London, v.44, p.485-499, 1993.

SKJEMSTAD, J.O.; CLARKE, P.; TAYLOR, J.A.; OADES, J.M.; McCLURE, S.G. The chemistry and nature of protected carbon in soil. *Australian Journal of Soil Research*, Melbourne, v.34, p.251-271, 1996.



SKJEMSTAD, J.O.; CLARKE, P.; GOLCHIN, A.; OADES, J.M. Characterization of soil organic matter by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. In: GADISCH, G.; GILLER, K.E. (Eds.) *Driven by nature: plant litter quality and decomposition*. Wallingford: CAB International, 1997. p.253-271.

SKJEMSTAD, J.O.; TAYLOR, J.A.; JANIK, L.J.; MARVANEK, S.P. Soil organic carbon dynamic under long-term sugarcane monoculture. *Australian Journal of Soil Research*, Melbourne, v.37, p.151-164, 1999.

SMERNIK, R.J.; OADES, J.M. Effects of added paramagnetic ions on the  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectrum of a de-ashed soil. *Geoderma*, Amsterdam, v.89, p.219-219, 1999.

SMITH, B.N.; EPSTEIN, S. Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios for higher plants. *Plant Physiology*, Rockville, v.47, p.380-384, 1971.

SOLLINS, P.; SPYCHER, G.; GLASSMAN, C.A. Net nitrogen mineralization from light-and heavy-fraction forest soil organic matter. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, v.16, n.1, p.31-37, 1984.

SPYCHER, G.; SOLLINS, P., ROSE, S. Carbon and nitrogen in the light fraction of a forest soil: vertical distribution and seasonal patterns. *Soil Science*, Baltimore, v.135, p.79-87, 1983.

STEELINK, C.; TOLLIN, G. Free radicals in soil. In: MCLAREN, A.D.; PETERSON, G.H. (Eds.) *Soil Biochemistry*. London: E. Arnold, 1985. v.1, p.147-162.

STEVENSON, F.J.; ELLIOT, E.T. Methodologies for assessing the quantity and quality of soil organic matter. In: COLEMAN, D.C.; OADES, J.M.; UEHARA, G. (Ed.) *Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems*. Honolulu: University of Hawaii, 1989. p.173-199.

STEVENSON, F.J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2ed. New York: J. Wiley, 1994. 496p.

TIESSEN, H.; STEWART, J.W.B. Particle-size fractions and their use in studies of soil organic matter: II. Cultivation effects on organic matter composition in size fractions. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.47, p.509-514, 1983.

TISDALL, J.M.; OADES, J.M. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science*, London, v.33, p.141-163, 1982.

TURCHENEK, L.W.; OADES, J.M. Fractionation of organo-mineral complexes by sedimentation and density techniques. *Geoderma*, Amsterdam, v.21, p.311-343, 1979.

VITORELLO, V.A. CERRI, C.C., ANDREUX, F.; FELLER, C.; VICTORIA, R.L. Organic Matter and Natural Carbon-13 Distribution in Forested and Cultivated Oxisols. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.53, p.773-778, 1989.

WERSHAW, R.L.; LEENHEER, A.; KENNEDY, K.R.; NOYES, T.I. Use of <sup>13</sup>C NMR and FTIR for elucidation of degradation pathways during natural litter decomposition and composting I. early stage leaf degradation. *Soil Science*, Baltimore, v.161, n.10, p.667-679, 1996.

WILSON, M.A. *NMR Techniques and applications in geochemistry and soil chemistry*. Oxford: Pergamon Press, 1987. 352p.